DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.006
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
132 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0132-03

VEGF在骨折愈合过程中对Ⅷ因子相关抗原表达变化影响的实验研究

初同伟[1],王正国[2],朱佩芳[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院骨科,重庆 400037;[2]附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)在骨折愈合过程中骨折端对Ⅷ因子相关抗原含量变化的影响,以确定VEGF对骨折端血管重建中的作用。方法 用105只大耳白兔制作桡骨骨折模型,随机分为对照组、应用VEGF组、拮抗VEGF组,分别于伤后不同时间利用Western blot方法测定各组动物骨折端Ⅷ因子相关抗原含量变化。结果 应用外源性VEGF后,骨折端Ⅷ因子相关抗原含量明显增加;拮抗VEGF则使骨折端Ⅷ因子相关抗原含量明显下降。结论 VEGF对骨折愈合过程中的血管重建具有重要作用,并可能作为一种重要因子参与了骨折愈合的修复过程。

关键词:骨折愈合;血管内皮生长因子;Ⅷ因子相关抗原含量
中图法分类号:R392.11;R392.13;R683.02 文献标识码:A

Effect of vascular endothelial growth factor on expression of factor Ⅷ related antigen in process of fracture healing

CHU Tong-wei, WANG Zheng-guo, ZHU Pei-fang (Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To study the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) to the contents of factor Ⅷ related antigen in order to definite the role of VEGF in the rebuilding of blood vessels in the fractured end. Methods One hundred and five rabbits were inflict to fracture in the radius, and then randomly divided into controlled group, VEGF group and anti-VEGF group. The changes of factor Ⅷ related antigen were assayed at intervals of different time with western blot. Results The contents of factor Ⅷ related antigen were increased obviously after application of ectogenous VGEF, but significantly decreased in the anti-VEGF group. Conclusion VEGF acts an important role in the rebuilding of blood vessels in the process of fracture healing, and takes part in the fracture repairing as one of important factors.

Key words fracture healing; vascular endothelial growth factor; factor Ⅷ related antigen

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)通过与血管内皮细胞膜上的受体结合,具有强大、特异性促血管内皮细胞增生和血管生成作用,是促血管再生的最终通道,而其他因子的促血管生成作用是全部或部分通过VEGF的作用得以实现[1]。研究表明,VEGF对很多生理和病理性过程中的血管形成有着极其重要的作用[2,3]。由于Ⅷ因子相关抗原目前被认为是最特异的血管标记物而在实验中被广泛用于对血管的检测[4,5],因此Ⅷ因子相关抗原含量的变化较为直接的反应了血管的多少。本实验研究了VEGF对骨折愈合过程中Ⅷ因子相关抗原表达变化的影响,以明确VEGF对骨折愈合过程中血管生成及重建的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

选用健康新西兰大耳白兔105只,体重2.5~3.0 kg,雌雄不限,随机分为对照组、应用外源性VEGF组、拮抗VEGF组,每组分为8、24、72 h,1、3、5、8周共7个时相点。按文献方法制备标准的兔左侧桡骨骨折动物模型。VEGF采用耳静脉推注法给药,每次应用VEGF 200 ng,2/d,共使用1周;拮抗VEGF采用腹腔注射VEGF多克隆抗体,400 ng/次,1/3 d,共使用3周。

1.2 组织取材及蛋白样品的制备

各组动物分别于伤后各时相点处死,取骨折端标本置于20%EDTA中4 ℃脱钙1周。取脱钙骨组织约100~200 mg按组织裂解法提取蛋白,用Bradford法测定蛋白含量,分装置于-20 ℃保存备用。

1.3 骨折端Ⅷ因子相关抗原表达的Western blot分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳采用4%浓缩胶,12%分离胶,上样量60 μg,电压100 V。电泳结束后取出凝胶,和相同大小的PVDF膜置于三层滤纸中间,放入转移槽中,80 mA转膜15 h。取出PVDF膜放入1%BSA/PBST 37 ℃封闭2 h,加鼠抗兔一抗、羊抗鼠IgG-HRP二抗杂交,化学发光试剂中反应至条带显现,然后在暗室中使X光胶片曝光,常规方法显影定影。

1.4 Western blot实验结果分析

实验共对5个骨折端蛋白样本进行检测。将X线胶片置于Gel Doc 2000图像分析系统,测定目的条带的平均光密度值(ODU/mm^2),并将5次实验结果的平均值作为蛋白含量的相对值。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054204)
作者简介:初同伟(1967-),男,山东省茌平县人,博士,主治医师,主要从事骨折愈合及脊髓损伤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68755114-74608
收稿日期:2001-06-05;修回日期:2001-11-10

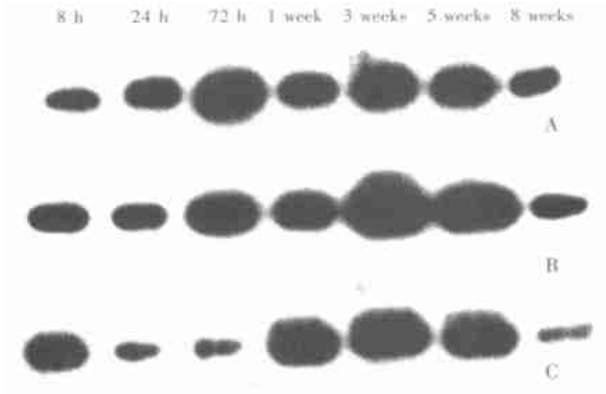
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5 统计学处理

蛋白含量检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并采用 Microsoft Excel 统计分析软件系统进行 t 检验。

2 结果

利用 Western blot 法对 5 个样本骨折端所提蛋白进行的Ⅷ因子相关抗原定量检测发现, 对照组、应用 VEGF 组及拮抗 VEGF 组各时相点骨折端都存在Ⅷ因子相关抗原蛋白表达条带, 见图 1。对 3 组动物骨折端Ⅷ因子相关抗原条带进行的定量检测结果(见表 1)表明: 应用 VEGF 组骨折端Ⅷ因子相关抗原含量在伤后 72 h 至 5 周明显高于对照组($P<0.05$); 伤后 8 h 拮抗 VEGF 组骨折端Ⅷ因子相关抗原含量与对照组无显著性差异($P>0.05$), 以后除伤后 3 周接近对照组外, 其它各时相点均低于对照组($P<0.05$)。



A: Control; B: VEGF group; C: Anti-VEGF group

图 1　Ⅷ因子相关抗原蛋白条带

Fig 1　Expression of Factor Ⅷ related antigen

表 1　3 组动物骨折端Ⅷ因子相关抗原蛋白含量比较(ODU/mm², $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of the contents of Factor Ⅷ related antigen at the fracture sites of 3 groups(ODU/mm², $\bar{x} \pm s$)

	Time after injury ($n=5$)						
	8 h	24 h	72 h	1 week	3 weeks	5 weeks	8 weeks
Control	12.45±0.45	14.28±0.41	25.69±0.57	22.47±0.47	25.94±0.16	20.29±0.35	10.85±0.61
VEGF group	12.84±0.60	13.69±0.61	28.79±0.46*	26.89±0.36*	36.68±0.62*	28.75±0.91*	9.80±0.61
Anti-VEGF group	12.62±0.67	3.22±0.58*	2.45±0.42*	19.04±0.83*	24.68±0.44	16.80±0.82*	2.73±0.47*

*: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

VEGF 通过与血管内皮细胞上的特异性受体受体结合, 具有强大、特异性促血管内皮细胞增生和血管生成作用, 是促血管再生的最终通道。其他因子的促血管生成作用是全部或部分通过 VEGF 的作用得以实现[1]。研究表明, VEGF 对很多生理和病理性过程中的血管形成有着极其重要的作用[2,3], 而血管生成对骨折修复具有重要意义[6]。Mohanti[7] 对骨折愈合后进行的病理观察发现, 骨折后血管自第 3 天起开始增生、发芽, 2 周时达高峰。那么 VEGF 对骨折愈合过程中血管生成的作用和意义如何, 目前尚未见有关该方面的详细研究。

Ⅷ因子相关抗原被认为是血管最特异的标记物[4,5], 因此骨折端该因子的含量变化直接反映了骨折端血管的多少。在本实验中, 我们利用 Western blot 技术对对照组骨折端Ⅷ因子相关抗原表达进行的统计分析显示, 其在骨折后 24 h 开始增高, 伤后 3 d 已经达到较高的水平, 该状态一直维持到骨折后的第 3 周, 到第 5 周时开始出现较明显的回落, 第 8 周时基本恢复到正常水平。与对照组骨折端Ⅷ因子相关抗原含量比较发现, 应用 VEGF 后 24 h 内两组间无明显差异, 骨折后 72 h 应用 VEGF 组动物骨折端Ⅷ因子相关抗原含量显著增加, 高于对照组, 这种现象一直维持到骨折后第 5 周, 第 8 周时两组间无显著差异。从对照组和应用 VEGF 组动物伤后骨折端Ⅷ因子相关抗原含量进行检测的结果可以看出: 骨折后 72 h 已经出现明显的血管再生, 伤后 72 h 至 3 周为骨折端血管生成的高峰期, 8 周时骨折端血管含量出现明显减少; 应用 VEGF 明显促进了骨折端血管生成, 但其在体内促血管生成的效果在骨折后 72 h 才能得以表现。根据实验组及对照组在骨折后的第 8 周骨折端Ⅷ因子相关抗原含量都恢复到较低水平这一现象说明, 骨折修复期间过度增生形成的血管在骨折愈合后出现退化。应用 VEGF 虽然使骨折端以血管含量为基础的Ⅷ因子相关抗原含量增加, 但并未呈现出线性的增高趋势, 而是表现为有波动的增加, 表明在外源性因子介入的情况下, 机体将致力于排除外来因子对机体所造成的影响, 维持一种平衡状态。至于为什么骨折后一定时期出现血管的退化, 而非无节制的呈现血管增生, 对此现象的详细机制有待于做进一步研究。

拮抗 VEGF 组动物骨折后 24 h 至 1 周的各时相点中, 骨折端血管含量明显低于对照组, 虽然在伤后第 3 周骨折端血管含量虽然一度和对照组接近, 但仍未达到对照组水平, 在 5 周和 8 周 2 个时相点再度明显低于对照组。有力的说明了骨折愈合过程中血管的生成与重建对 VEGF 的依赖作用, VEGF 的缺乏可导致血管生成的障碍。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

综上所述，应用外源性 VEGF 加速了骨折端的血管生成；拮抗 VEGF 明显抑制了骨折愈合过程中的血管的重建。该因子对骨折愈合过程中的血管生成具有重要作用，并可能作为一种重要因子参与了骨折愈合的修复过程。

参考文献：

[1] Zhang Q X, Magovern C J, Mack C A, *et al*. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis[J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 147—154.
[2] Ilan N, Mahooti S, Madri J A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis [J]. J Cell Sci, 1998, 111 (Pt 24): 3 621—3 631.
[3] Mohammadi M, Froum S, Hamby J M, *et al*. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain[J]. EMBO J, 1998, 17(20): 5 896—5 904.
[4] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognositic factor in cancer [J]. Am J Pathol. 1995, 147(1): 9—19.
[5] Cao Y, O'Reilly M S, Marshall B, *et al*. Expression of angiostatine cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases[J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1 055—1 063.
[6] Rowe N M, Mehrara B J, Luchs J S, *et al*. Angiogenesis during mandibular distraction osteogenesis[J]. Ann Plast Surg, 1999, 42(5): 470—475.
[7] Mohanti R C, Mahakul N C. Vascular response in fractured limbs with and without immobilization: an experimental study on rabbits[J]. Int Orthop, 1983, 7(3): 173—177.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)02-0134-01

断层标本三维重建技术的几点改进

Improvement of three-dimensional reconstruction techniques in the sectional specimens

谭立文，宋 林 （第三军医大学基础医学部解剖学教研室，重庆 400038）

定标线的设置与断面数据的采集量直接关系到三维重建图像的失真度。预置定标线是断面标本进行三维重建的依据[1]。定标线决定了重建过程中片间各结构的位置关系。而断面数据的采集量决定了重建结构的精细度，特别是细小结构。

1 定标线的埋设[2]

对于需作三维重建的断层标本，特别是生物塑化薄层断面标本，在塑化前须埋设至少 2 条平行的与锯切面垂直的定标线。通常是方形标本块可直接用深色细线缠绕在标本块表面，不规则形状标本块可用方形塑料支架缠绕 2 根细线，并套在标本块外面。塑化后，定标线就埋置于塑化标本块内，每片锯切断面上都会留下 2 点相同位置关系的定标点。这两个定标点就决定了在重建过程中每个断层的对位关系。

如果标本在塑化前未作定标线或所作定标有误差，还可利用塑化标本的外形来作定标线。即保证锯切面垂直方向上有 2 个平整的相邻面，锯切后用卡尺夹住每一片的这 2 个边，在扫描仪下按相同条件（大小、色彩、分辨率、比例等）扫描。这样，标本在重建过程中就不需对准、缩放等操作步骤了。其实际大小的比例可任取一片标本上的两点来定制。由于有卡尺夹持，即使在锯切时造成边角缺损，只要两个定位边上有任意 2 个点是原断面定位边上的点，就可保证该断面与其它断面的位置关系。

2 利用断层的上、下两个锯切面采集数据

目前采用冰冻或塑化方法制作的断层标本，通常厚度为 1～10 mm。在标本锯切过程中存在一定厚度的锯路损耗。尽管标本因锯路损耗掉的信息我们无法直接得到，但是，如果我们将每个锯路看作是一个假想的断层，每个断层就有两个假想的面，每一面的图像正好是相邻断层面图像的镜像，即它们互为反象关系。因此，在计算机中可把断层的一面观察图像作一次水平或垂直翻转，这样该观察面便可当作相邻锯路面使用，其观察方向也与另一面一致。在三维重建过程中，可把每一张切片的上、下两个面各当作一张切片使用，从面增加片间数据，减小重建后结构的失真度。用带锯锯切的塑化标本，在制作切片时，设定片厚与锯路损耗一致，则比较方便。例如，在我们的实验中锯路损耗为 1.2 mm，实际片厚 1.2 mm，只用各断层的上面或下面，那么片间距为 2.4 mm；如果每一断层的上、下两个面都利用，则片间距为 1.2 mm。这样，可以在不降低锯切厚度，不增加切片数量的情况下，使重建采集的信息量增加一倍，重建结构的真实性更强、更细腻，表面更平滑。如果片厚与锯路损耗不相同，可以在三维重建系统中设置不同片间距离的调节属性，并计算出各自的三维坐标位置。

关键词：三维重建；断层标本
中图法分类号：R322-34 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张绍祥，刘正津，何光篪. 生物塑化薄层连续断面的计算机三维重建[J]. 解剖学报，1996，27(2)：113.
[2] 高全胜，谭立文，应大君. 大体标本冰冻薄层断面切片机的研制[J]. 第三军医大学学报，2001，23(11)：1 340—1 341.

作者简介：谭立文(1968—)，男，重庆永川市人，实验师，主要从事薄层断面影像解剖学方面的研究。电话：(023)68752225

收稿日期：2000-04-26；修回日期：2000-07-18

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net